

#2

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 22 OCT. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**  
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**  
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*01

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260599

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>15 OCT 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>15 OCT. 2002</b>		<b>NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE <b>CABINET HERRBURGER</b> <b>115 Boulevard Haussmann</b> <b>75008 PARIS</b>	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif)			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b> <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
<b>NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		N°	Date
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) Procédé pour produire un mammifère rendu résistant à une infection par un alpha herpès virus par transgénèse germinale ainsi que mammifère obtenu par la mise en oeuvre de ce procédé			
<b>DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>DEMANDEUR</b>		<input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		FRANCE HYBRIDES	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse		Domaine du Grand Puits	
Rue			
Code postal et ville		45110	CHATEAUNEUF SUR LOIRE
Pays		FRANCE	
Nationalité		française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

RECEVÉ À L'INPI  
75 OCT 2002  
REMISE DES PIÈCES  
DATE 75 INPI PARIS  
LIEU 0212775  
N° D'ENREGISTREMENT  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 260099

Vos références pour ce dossier :  
(facultatif)

☒ MANDATAIRE

Nom

Prénom

Cabinet ou Société

CABINET HERRBURGER

N° de pouvoir permanent et/ou  
de lien contractuel

Adresse

Rue

115 Boulevard Haussmann

Code postal et ville

75008 PARIS

N° de téléphone (facultatif)

01 44 51 68 00

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

☒ INVENTEUR (S)

Les inventeurs sont les demandeurs

☐ Oui

☒ Non

Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée

☒ RAPPORT DE RECHERCHE

Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)

Établissement immédiat  
ou établissement différé

☒

☐

Paiement échelonné de la redevance

Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques

☐ Oui

☒ Non

☒ RÉDUCTION DU TAUX  
DES REDEVANCES

Uniquement pour les personnes physiques

☐ Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)

☐ Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :

Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite»,  
indiquez le nombre de pages jointes

☒ SIGNATURE DU DEMANDEUR  
OU DU MANDATAIRE  
(Nom et qualité du signataire)

CABINET HERRBURGER  
Pierre HERRBURGER  
CPI 92.1114

VISA DE LA PRÉFECTURE  
OU DE L'INPI

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

On connaît différents virus de type herpès qui se distinguent par leur génome ainsi que par leurs caractéristiques biologiques.

Une sous famille de ces virus correspond aux alpha herpès virus parmi lesquels on peut nommer les virus herpès simplex humain de type 1 et de type 2 (HSV-1 et HSV-2), le virus de la maladie d'Aujeszky ou Pseudorabies virus (PRV) et l'herpès virus bovin de type 1 (BHV-1).

Tous ces virus présentent la particularité d'être neurotropes et d'avoir un cycle de réplication très bref et un large spectre d'hôte.

L'infection par ces virus provoque des lésions de l'épiderme, se situant en règle générale au niveau des muqueuses, suivies d'une propagation du virus au système nerveux pouvant y entraîner des inflammations aiguës, ainsi que des infections latentes.

Parmi les alpha herpès virus entraînant les ravages les plus importants, on peut citer le virus PRV qui est un agent pathogène d'une importance économique majeure en production porcine tant par le coût direct des pathologies induites que par celui des moyens de lutte mis en œuvre.

Ce virus est largement présent dans la plupart des régions de forte production porcine (Europe, Amérique du Nord, Asie).

Il existe actuellement plusieurs vaccins contre le virus PRV qui représentent un marché important à l'échelle mondiale.

Une telle vaccination n'est cependant pas sans inconvénients compte tenu en particulier du coût entraîné par la nécessité de vacciner une large proportion des animaux d'un troupeau et les problèmes pratiques liés à cette nécessité qui rendent cette opération particulièrement incommode, ce d'autant plus qu'il est en général nécessaire de faire plusieurs injections.

Le coût et les contraintes de cette opération peuvent en limiter l'usage et par là même également l'efficacité.

Des stratégies d'éradication du virus sont également utilisées avec des résultats variables mais toujours fragiles.

Par suite, la conception d'un procédé permettant d'engendrer des lignées de porcs transgéniques constitutivement résistants au virus PRV aurait un intérêt économique considérable.

L'invention a pour objet de proposer un tel procédé.

Celui-ci a pu être conçu grâce à des recherches préalables effectuées sur un modèle souris, qui tout comme le porc est sensible à certains alpha herpès virus et en particulier aux virus HSV1 et PRV.

Il est connu que les alpha herpès virus se lient aux cellules d'abord grâce à l'interaction d'une glycoprotéine virale gC, entrant dans la constitution de la membrane du virion et de l'héparane sulfate présent à la surface des cellules, alors que la fusion ultérieure entre l'enveloppe du virion et la membrane cellulaire fait, quant à elle, intervenir d'autres glycoprotéines (gB, gD, gH et gL).

De nombreux travaux ont porté sur l'étude de récepteurs potentiels des alpha herpès virus présents à la surface des cellules de mammifères hôtes ayant une capacité de fixation de la particule virale et pouvant éventuellement neutraliser ainsi son pouvoir infectieux.

Quatre récepteurs humains des alpha herpès virus ont été identifiés à ce jour à savoir :

- le HVEM ou HveA qui est un médiateur d'entrée des virus HVS1 et HVS2 mais pas du virus PRV (Montgomery, R. I., Warner, M. S., Lum B.J., and Spear, P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**, 427-436).
  - trois membres de la superfamille des immunoglobulines (HveB ou nectin-2 ; HveC ou nectin-1 et HveD)
- (Cocchi, F., Menotti, L., Mirandola, P., Lopez, M., and Campadelli-Fiume, G. (1998). The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin subfamily related to the poliovirus receptor has the attribute of a bona fide receptor for herpes simplex virus types 1 and 2 in human cells. *J. Virol.* **72**, 9992-10002 ;
- Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Eisenberg, R. J., Cohen G. H., and Spear, P. G. (1998) Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **280**, 1618-1620 ;
- Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D., and Spear, P. G. (1999). A novel role for 3-O-sulfate heparan sulfate in herpes simplex virus entry. *Cell* **99**, 13-22 ;
- Warner, M. S., Martinez, W., Geraghty, R. J., Montgomery, R. I., Witbeck, J. C., Xu, R., Eisenberg, R ; J., Cohen, G. H., and Spear, P. G. (1998). A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by herpes simplex virus type 2, mutants of herpes simplex virus type 1 and pseudorabies virus. *Virology* **246**, 179-189.

Selon les publications Spear, P. G. (1993). Entry of alpha-herpesviruses into cells. *Semin. Virol.* 4, 167-180 ; Campadelli-Fiume, G., Arsenakis, M., Farabegoli, F., and Roizman, B. (1988). Entry of herpes simplex virus 1 in BJ cells that constitutively express viral glycoprotein D is by endocytosis and results in degradation of the virus. *J. Virol.* 62, 159-167, il a été suggéré que, outre la liaison initiale avec l'héparane sulfate, c'est l'interaction de la glycoprotéine gD de l'alpha herpes virus avec un récepteur présent à la surface de la cellule qui permet l'entrée du virus sous une forme infectieuse et que dans certains types de cellules, les virus HSV-1, PRV et BHV-1 peuvent utiliser un récepteur commun de la glycoprotéine gD pour entrer dans la cellule.

Il a été montré que la protéine gD des virus HSV1 et HSV2 est ainsi un ligand fort de la protéine HVEM exprimée par l'homme et de celle exprimée par la souris, ainsi que de la protéine HveC ou nectin-1 exprimée par l'homme.

La protéine gD du virus PRV n'est pas en revanche un ligand de la protéine HVEM mais constitue un ligand fort de la protéine HveC exprimée par le porc, y compris des formes tronquées de celle-ci. (Milne, R. S. B., Connolly, S. A., Krummenacher, C., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (2001). Porcine HveC, a member of the highly conserved HveC/neurin 1 family, is a functional alphaherpesvirus receptor. *Virology* 281, 315-328.).

Ces capacités de liaison à la glycoprotéine virale gD sont plus particulièrement attribuées au domaine V pour HveC et aux deux premiers domaines riches en cystéine (« CRD ») pour HVEM (Structure-Based Analysis of the Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Binding Site Present on Herpesvirus Entry Mediator HevA (HVEM). Connolly SA, Landsburg DJ, Carfi A, Wiley DC, Eisenberg RJ, Cohen GH ; *J virol* 2002, Nov 1 ; 76(21) : 10894-10904).

A partir de ces connaissances préalables, il est proposé conformément à l'invention un procédé pour produire un mammifère appartenant à une espèce non humaine rendu résistant à une infection par un alpha herpes virus donné par transgénèse germinale, caractérisé en ce que l'on introduit par insertion ou recombinaison homologue dans le génome des cellules constituant la lignée germinale du mammifère ou de l'un de ces ancêtres un transgène codant pour une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire d'un récepteur cellulaire potentiel de l'alpha herpes virus visé ou de l'une de ses parties et d'autre

part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline, notamment d'une immunoglobuline de type gamma, dans un système d'expression approprié.

----- Selon l'invention, le récepteur de l'alpha herpès virus visé  
5 et/ou l'immunoglobuline appartiennent de préférence à l'espèce homologue.

Le récepteur utilisé est une protéine membranaire dont une glycoprotéine virale de surface, telle gD, est un ligand fort, telle que HveC chez le porc pour le virus PRV ou HVEM chez la souris pour le virus HSV-  
10 1.

On pourra également n'utiliser qu'une partie du récepteur telle que le domaine V pour HveC ou les deux premiers domaines riches en cystéine pour HVEM, ou même, le cas échéant des formes mutées de ces parties, sélectionnées pour leur capacité de liaison avec le virus.

15 La première étape du procédé conforme à l'invention correspond donc à la préparation du transgène qui peut être effectuée en mettant en œuvre des méthodes bien connues des spécialistes et abondamment décrites dans la littérature constituant à cloner :

1. d'une part, soit l'ADN complémentaire de l'ARN transcrit pour le gène  
20 du récepteur cellulaire choisi, à partir d'une préparation d'ARN extraite d'un prélèvement de tissu pris sur un mammifère, soit la région chromosomique (ensemble des exons et introns) constituant le gène de ce récepteur à partir d'une préparation d'ADN génomique extraite également d'un prélèvement de tissu réalisé sur un mammifère, soit une  
25 -- construction chimérique constituée pour partie de l'ADNc et du fragment génomique correspondant (« minigène »). On utilisera seulement la partie correspondant au domaine extracellulaire de ce récepteur, ou dans une autre version du procédé, uniquement la partie montrée responsable de ses capacités de fixation aux glycoprotéines virales de surface du virion au sein de ce domaine extracellulaire,  
30

2. d'autre part, soit l'ADNc complémentaire de l'ARN transcrit pour l'un des gènes de chaîne lourde pour la classe et la sous-classe d'immunoglobuline choisie (par exemple G1), à partir d'une préparation d'ARN extraite d'un prélèvement de tissu pris sur un mammifère, soit  
35 la région chromosomique (ensemble des exons et introns) constituant ce gène de chaîne lourde à partir d'une préparation d'ADN génomique extraite également d'un prélèvement de tissu réalisé sur un mammifère, soit une construction chimérique constituée pour partie de l'ADNc

et du fragment génomique correspondant (« minigène »). La construction réalisée retiendra avantageusement les régions codant pour les domaines Hinge CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> uniquement de la chaîne lourde d'immunoglobuline choisie (fraction cristallisable). \_\_\_\_\_

5 Un exemple d'une telle construction pour l'immunoglobuline humaine G1 est décrit dans la publication CTLA-4 Is a Second Receptor for the B Cell Activation Antigen B7. By Peter S. Linsley, William Brady, Mark Urnes, Laura S. Grosmaire, Nitin K. Damle, and Jeffrey A. Ledbetter ; J. Exp. Med. © The Rockefeller University Press ; volume 174, Septem-  
10 bre 1991, 561-569.

Les opérations de clonage seront réalisées à partir des connaissances préalables existantes relatives aux gènes utilisés, à savoir leur séquence, leur localisation chromosomique, ceci si possible dans l'espèce homologue, sinon en se basant sur les séquences existantes pour  
15 ce gène chez d'autres mammifères.

Ces opérations pourront être réalisées par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) précédée d'une étape de transcription reverse pour l'ADN complémentaire ou recherche de clones génomiques susceptibles de s'hybrider avec une sonde spécifique, de produire un  
20 amplicon PCR spécifique du gène recherché.

Cette construction sera réalisée de façon à joindre l'ADN codant pour le domaine extracellulaire du récepteur ou l'une de ses parties en 5' de l'ADN codant pour le fragment cristallisable de la chaîne lourde d'immunoglobuline terminé par un codon stop en respectant le cadre de lecture original des deux gènes, et éventuellement la nature et  
25 l'efficacité des jonctions introns-extrons s'ils ont été inclus, de façon à assurer, au final, l'expression d'une protéine chimérique constituée pour sa partie amino terminale du polypeptide correspondant au domaine extracellulaire du récepteur cellulaire ou à l'une de ses sous parties (domaine V notamment pour HveC) et pour sa partie carboxi terminale des domaines  
30 Hinge CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> de la chaîne lourde d'immunoglobuline.

Cette construction sera réalisée dans un vecteur d'expression permettant une expression forte de la protéine chimérique dans un ou plusieurs compartiments biologiques de l'hôte où elle permettra la protection des cellules de manière à rendre l'hôte globalement résistant à l'infection initiale ou à son développement. Le procédé consistera  
35 notamment à utiliser des systèmes d'expression actifs soit de façon cons-



titutive dans l'ensemble des cellules, soit dans les tissus épithéliaux et/ou dans les tissus du système nerveux.

Le vecteur d'expression pourra comprendre une région promotrice, ~~un signal~~ de terminaison, des éléments stimulateurs de la transcription, des séquences isolatrices du contexte chromatinien, d'autres unités de transcription, tous éléments susceptibles d'assurer l'expression souhaitée.

Le procédé consistera avantageusement en l'emploi de systèmes d'expression constitués à partir de séquences régulatrices clonées chez l'espèce homologue, ou pour l'application à des animaux de rente chez d'autres animaux d'élevage habituellement consommés par l'homme.

La seconde étape du procédé conforme à l'invention consiste à introduire le transgène ainsi obtenu dans le génome des cellules constituant la lignée germinale du mammifère hôte visé par insertion ou recombinaison homologue, là encore par une méthode bien connue des spécialistes de sorte que ce transgène s'intègre dans le patrimoine génétique de ce mammifère.

On pourra notamment utiliser à cette fin la micro injection pronucléaire ou le transfert nucléaire de cellules transformées en culture.

L'invention concerne également un mammifère appartenant à une espèce non humaine rendu résistant par transgénèse germinale à une infection par un alpha herpès virus par l'effet de l'expression d'une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire d'un récepteur de l'alpha herpès virus ou de l'une de ses parties de préférence de l'espèce homologue, et d'autre part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline, notamment d'une immunoglobuline de type gamma de préférence de l'espèce homologue.

L'invention concerne également le descendant d'un tel mammifère, ayant hérité par descendance du transgénèse inséré dans le génome de la lignée germinale de l'un de ses parents.

Selon l'invention, le récepteur spécifique de l'alpha herpès virus peut avantageusement être la nectin-1 ou HveC, l'alpha herpès virus le virus PRV et le mammifère appartenir à l'espèce porcine.

Il est essentiel conformément à l'invention que l'opération de transgénèse soit une transgénèse germinale de façon que les descendants du mammifère soient eux aussi susceptibles d'exprimer la protéine chimérique.

Plusieurs exemples de séquences de protéines chimériques conformes à l'invention sont représentées ci-dessous :

Il s'agit de séquences en acides aminés exprimées selon le code à une lettre en usage. Elles comprennent le peptide signal à l'extrémité amino terminale qui sera traité lors de la maturation. Elles sont terminées par un codon stop figuré ici par \*.

**Séquence N°1 : Utilisation du récepteur HVEM cloné chez la souris (séquence en italique) et de la fraction cristallisable d'immunoglobuline humaine G1, dans une protéine chimérique susceptible de conférer la résistance au virus HSV-1 :**

MEPLPGWGSAPWSQAPTDNTFRLVPCVFLNLLQRISAQPSCRQEEFLVGDECC  
PMCNPGYHVKQVCSEHTGTVCAPCPPQTYTAHANGLSKCLPCGVCDPDMGLLT  
WQECSSWKDTCRCIPGYFCENQDGSCHCSTCLQHTTCPGQORVEKRGTHDQD  
TVCADCLTGTFSLGGTQEECLPWTNCSAFQQEVRRGTNSTD

TTCSS

DPEEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD  
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK\*

**Séquence N°2 : Utilisation du récepteur HveC cloné chez la porc (séquence en italique) et de la fraction cristallisable d'immunoglobuline humaine G1, dans une protéine chimérique susceptible de conférer la résistance au virus PRV :**

MARMGLAGAAGRWWGLALGLTAFFLPGAHTQVVQVND SMYGFIGTDVVLHCS  
FANPLPGVKITQVTWQKATNGSKQNVAIYNPAMGVSVLAPYRERVEFLRPSFTD  
GTIRLSRLELEDEGVYICEFATFPAGNRESQLNLTVMKPTNWIEGTQAVLRAKK  
GKDDKVLVATCTSANGKPPSVVSWETHLKGEAEYQEIRNPNGTVTVISRYRLVP  
SREDHRQSLACIVNYHMDRFRESLTLNVQYEPEVTIEGFDGNWYLQRM DVKLT  
CKADANPPATEYHWTTLNGSLPKGVEAQNRTLFFRGPINYSMAGTYICEATNPIG  
TRSGQVEVNITEF

PYTPSPPEHA

DPEEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD  
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK  
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV  
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK\*

Plusieurs exemples de séquences de protéines chimériques conformes à l'invention sont jointes en annexe.

Il s'agit de séquences en acides aminés exprimées selon le code à une lettre en usage. Elles comprennent le peptide-signal à l'extrémité amino terminale qui sera processé lors de la maturation. Elles sont terminées par un codon stop figure ici par \*.

Une protéine chimérique conforme à ce modèle est également décrite dans le document JP-2001-328430 dans le cadre d'une autre application.

La faisabilité du procédé conforme à l'invention a été confirmée par des résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de l'analyse in vivo de la résistance au virus herpes simplex humain de type 1 (HSV-1) de souris transgéniques.

Selon ces tests on a introduit par transgénèse germinale dans l'ADN de ces souris un transgène codant pour une protéine chimérique constituée du domaine extracellulaire du récepteur murin HVEM de ce virus et de la portion cristallisable Fc de l'immunoglobuline IgG-1 humaine.

Le domaine extracellulaire murin HveM a été cloné par RT PCR à partir d'une préparation d'ARN extraite de cellules de rate stimulées par la concavaline A, obtenues sur des souris de souche BALB/c.

Les amorces utilisées pour la réaction RT PCR étaient 5'-TAACTCGAGCTCTTGGCCTGAAGTTTC-3' et 5'-TTAAGGATCOGAGGAGCAGGTGGTGTCT-3'.

L'ADNc a été inséré dans les sites de restriction XhoI et BamHI d'un plasmide portant la séquence du fragment cristallisable de l'immunoglobuline G1 humaine (comme décrit dans la publication Nakagawa I., Murakami, M., Ijima, K., Chikuma, S., Saito, I., Kanegae, Y., Ishikura, H., Yoshiki, T., Okamoto, H., Kitabatake, A., and Uede, T. (1998). Persistent and secondary adenovirus-mediated hepatic gene expression using adenovirus vector containing CTLA4IgG. Human Gene Therapy 9, 1739-1745), sous le contrôle du promoteur CAG (promoteur de la  $\beta$  actin) connu pour permettre une expression constitutive élevée dans tout type de cellule (Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene 108, 193-200).

On a créé par micro injection du fragment PmeI/SalI de ce plasmide, contenant le facteur de stimulation de la transcription du gène viral CMV IE, le promoteur du gène Beta actin de la poule, la séquence de

Séquence N°3 : Utilisation du domaine V seul du récepteur HveC cloné chez le porc (séquence en italique) et de la fraction cristallisable d'Immunoglobuline G1 porcine, dans une protéine chimérique susceptible de conférer la résistance au virus PRV :

5 MARMGLAGAAGRWWGLALGLTAFFLPGAHTQVVQVNDSEMYGFIGTDVVLHCS  
FANPLPGVKITQVTWQKATNGSKQNVAIYNPAMGVSVLAPYRERVEFLRPSFTD  
GTIRLSRLELEDEGVYICEFATFPAGNRESQNLNTVM  
GS  
VGIHQPTCPICPGCEVAGPSVFIFPPKPKDTLMISQTPEVTCVVVDVSKEHAE  
10 VQFSWYVDGVEVHTAETRPKEEQFNSTYRVVSVLP IQHQDWLKGKEFKCKV  
NNVDLPAPITRTISKAIGQSREPQVYTLPPPAEELSRSKVTLTCLVIGFYPPDIHV  
EWKSNGQPEPENTYRTPPQQDVGDTFFLYSKLAVDKARWDHGDKFECV  
MHEALHNHYTQKSISKQKG\*

15 Une protéine chimérique conforme à ce modèle est également décrite dans le document JP-2001-328430 dans le cadre d'une autre application.

La faisabilité du procédé conforme à l'invention a été confirmée par des résultats expérimentaux obtenus dans le cadre de l'analyse in vivo de la résistance au virus herpes simplex humain de type  
20 1 (HSV-1) de souris transgéniques.

Selon ces tests on a introduit par transgénèse germinale dans l'ADN de ces souris un transgène codant pour une protéine chimérique constituée du domaine extracellulaire du récepteur murin HVEM de ce virus et de la portion cristallisable Fc de l'immunoglobuline IgG-1 hu-  
25 maine.

Le domaine extracellulaire murin HveM a été cloné par RT PCR à partir d'une préparation d'ARN extraite de cellules de rate stimulées par la concavaline A, obtenues sur des souris de souche BALB/c.

Les amorces utilisées pour la réaction RT PCR étaient 5'-  
30 TAACTCGAGCTCTTGGCTGAAGTTTC-3' et 5'-TTAAGGATCCGAGGAGCAGGTGGTGTCT-3'.

L'ADNc a été inséré dans les sites de restriction XhoI et BamHI d'un plasmide portant la séquence du fragment cristallisable de l'immunoglobuline G1 humaine (comme décrit dans la publication Nakagawa I., Murakami, M., Ijima, K., Chikuma, S., Saito, I., Kanegae, Y., Ishikura, H., Yoshiki, T., Okamoto, H., Kitabatake, A., and Uede, T. (1998). Persistent and secondary adenovirus-mediated hepatic gene expression using adenovirus vector containing CTLA4IgG. Human Gene Therapy 9, 1739-1745), sous le contrôle du promoteur CAG (promoteur de la  $\beta$  actin)

la protéine HVEMIg et le signal de polyadénylation 3' du locus Beta globin de lapin, dans les pronucléi d'embryons fécondés (souris F1 C57 BL/6 X SJL) trois lignées A, B, C de souris transgéniques chacune issue d'un fondateur indépendant exprimant cette protéine chimérique  
 5 HVEM Ig.

La présence de la protéine HVEMIg a été détectée comme bande spécifique révélée par l'anticorps anti-HVEMIg de l'espèce lapine par immunoélectrophorèse dans le sérum des trois lignées de souris transgéniques, avec un titre en moyenne plus faible pour les souris de la  
 10 lignée B.

La construction effectuée est représentée schématiquement sur la figure 1.

La concentration en protéine chimérique HVEMIg du sérum des souris des trois lignées transgéniques A B C est représentée sur les  
 15 tableaux 1, 2, 3 et 4 joints en annexe.

Les souris transgéniques de trois lignées se sont développées normalement et on n'a pas constaté de différences entre les poids de ces souris et ceux de leurs homologues non transgéniques de la même portée.

Pour déterminer si les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HVEMIg étaient effectivement protégées contre le virus HSV-1, on a inoculé par voie intraveineuse et une dose de  $10^9$  ufc correspondant à dix fois la dose létale (10 DL 50) de virus, des souris transgéniques et des souris non transgéniques de contrôle de la même  
 20 portée.

La DL 50 a été déterminée initialement chez la lignée de souris la moins sensible des deux ayant servi à la production des animaux transgéniques hybrides.

Selon les figures 2, 3, et 4 on a dénombré les souris trans-  
 30 géniques T<sub>g</sub> respectivement des lignées A B et C et les souris non transgéniques non T<sub>g</sub> demeurées vivantes jusqu'à 14 jours après l'infection.

On a ainsi pu constater que toutes les lignées de souris transgéniques étaient résistantes au virus HSV-1.

Plus précisément toutes les souris transgéniques des li-  
 35 gnées A et C ont survécu à l'inoculation par le virus et sont restées en bonne santé pendant plusieurs mois après l'essai (tableaux 1 et 4).

Seule une souris transgénique de la lignée B, est décédée après l'inoculation par le virus tandis que les six autres ont survécu (ta-

connu pour permettre une expression constitutive élevée dans tout type de cellule (Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-200).

5 On a créé par micro injection du fragment PmeI/Sall de ce plasmide, contenant le facteur de stimulation de la transcription du gène viral CMV IE, le promoteur du gène Beta actin de la poule, la séquence de la protéine HVEMIg et le signal de polyadénylation 3' du locus Beta globin de lapin, dans les pronucléi d'embryons fécondés (souris  
10 F1 C57 BL/6 X SJL) trois lignées A, B, C de souris transgéniques chacune issue d'un fondateur indépendant exprimant cette protéine chimérique HVEM Ig.

La présence de la protéine HVEMIg a été détectée comme bande spécifique révélée par l'anticorps anti-HVEMIg de l'espèce lapine.  
15 par immunoélectrophorèse dans le sérum des trois lignées de souris transgéniques, avec un titre en moyenne plus faible pour les souris de la lignée B.

La construction effectuée est représentée schématiquement sur la figure 1.

20 La concentration en protéine chimérique HVEMIg du sérum des souris des trois lignées transgéniques A B C est représentée sur les tableaux 1, 2, 3 et 4 joints en annexe.

Les souris transgéniques de trois lignées se sont développées normalement et on n'a pas constaté de différences entre les poids de  
25 ces souris et ceux de leurs homologues non transgéniques de la même portée.

Pour déterminer si les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HVEMIg étaient effectivement protégées contre le virus HSV-1, on a inoculé par voie intraveineuse et une dose de  $10^9$  ufc  
30 correspondant à dix fois la dose létale (10 DL 50) de virus, des souris transgéniques et des souris non transgéniques de contrôle de la même portée.

La DL 50 a été déterminée initialement chez la lignée de souris la moins sensible des deux ayant servi à la production des animaux  
35 transgéniques hybrides.

Selon les figures 2, 3, et 4 on a dénombré les souris transgéniques  $T_g$  respectivement des lignées A B et C et les souris non transgéniques non  $T_g$  demeurées vivantes jusqu'à 14 jours après l'infection.

bleau 3), mais la lignée B est celle pour laquelle les taux sériques mesurés en HVEMIg étaient les plus faibles.

En revanche, six des sept souris non transgéniques des mêmes portées que les souris transgéniques de la lignée A, 13 des 14 souris non transgéniques des mêmes portées que les souris transgéniques de la lignée B et six des sept souris non transgéniques des mêmes portées que les souris transgéniques de la lignée C ont développé des symptômes tels qu'une paralysie et sont décédées dans les 14 jours qui ont suivi l'inoculation par le virus HSV-1.

On a recherché l'expression du LAT du virus HSV-1 dans les ganglions trigéminaux des souris survivantes après l'inoculation par la méthode décrite dans les publications.

- Spivak, J. G., and Fraser, N. W. (1987). Detection of herpes virus type 1 transcripts during latent infections in mice. *J. Virol.*, **61**, 3841-3847.
- Stevens, J. G., and Cook, M. L. (1971). Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Science* **173**, 843-845.

On a ainsi mis en œuvre la méthode de RT-PCR de façon à détecter l'expression du LAT.

Celle-ci a été observée chez les souris non transgéniques ayant développé des symptômes et chez une seule souris transgénique de la lignée B n'ayant pas présenté de symptômes, mais n'a en revanche pas été observée chez toutes les autres souris transgéniques testées ni chez les souris non transgéniques survivantes n'ayant pas développé de symptômes.

Dans le cadre de cette étude on a également effectué un essai de contrôle dans le but de déterminer si les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HVEMIg étaient protégées contre le virus PRV ce alors que le récepteur HVEM n'est pas un récepteur de la glycoprotéine gD du virus PRV.

A cet effet, on a inoculé par voie intraveineuse et par une dose correspondant à 10 fois la dose létale (10 LD 50) de virus PRV, des souris transgéniques de la lignée A et des souris non transgéniques de la même portée (tableau 2 et figure 5).

On a ainsi pu constater qu'à l'exception d'une souris transgénique qui a survécu pendant 10 jours toutes les souris sont décédées dans les cinq jours suivant l'inoculation par le virus PRV.

Par suite les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HVEMIg ne se sont pas révélées protégées contre le virus PRV.

On a ainsi pu constater que toutes les lignées de souris transgéniques étaient résistantes au virus HSV-1.

Plus précisément toutes les souris transgéniques des lignées A et C ont survécu à l'inoculation par le virus et sont restées en  
5 bonne santé pendant plusieurs mois après l'essai (tableaux 1 et 4).

Seule une souris transgénique de la lignée B, est décédée après l'inoculation par le virus tandis que les six autres ont survécu (tableau 3), mais la lignée B est celle pour laquelle les taux sériques mesurés en HVEMIg étaient les plus faibles.

10 En revanche, six des sept souris non transgéniques des mêmes portées que les souris transgéniques de la lignée A, 13 des 14 souris non transgéniques des mêmes portées que les souris transgéniques de la lignée B et six des sept souris non transgéniques des mêmes portées que les souris transgéniques de la lignée C ont développé des symptômes  
15 tels qu'une paralysie et sont décédées dans les 14 jours qui ont suivi l'inoculation par le virus HSV-1.

On a recherché l'expression du LAT du virus HSV-1 dans les ganglions trigéminaux des souris survivantes après l'inoculation par la méthode décrite dans les publications.

- 20 - Spivak, J. G., and Fraser, N. W. (1987). Detection of herpes virus type 1 transcripts during latent infections in mice. *J. Virol.*, **61**, 3841-3847.  
- Stevens, J. G., and Cook, M. L. (1971). Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Science* **173**, 843-845.

On a ainsi mis en œuvre la méthode de RT-PCR de façon à  
25 détecter l'expression du LAT.

Celle-ci a été observée chez les souris non transgéniques ayant développé des symptômes et chez une seule souris transgénique de la lignée B n'ayant pas présenté de symptômes, mais n'a en revanche pas été observée chez toutes les autres souris transgéniques testées ni chez les  
30 souris non transgéniques survivantes n'ayant pas développé de symptômes.

Dans le cadre de cette étude on a également effectué un essai de contrôle dans le but de déterminer si les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HVEMIg étaient protégées contre le virus  
35 PRV ce alors que le récepteur HVEM n'est pas un récepteur de la glycoprotéine gD du virus PRV.

A cet effet, on a inoculé par voie intraveineuse et par une dose correspondant à 10 fois la dose létale (10 LD 50) de virus PRV, des



Dans le cadre de cette étude, on a également cherché à déterminer si la résistance des souris transgéniques à l'inoculation par le virus HSV-1 ayant pu être constatée *in vivo* s'accompagnait en parallèle d'une résistance des cellules de ces souris une fois isolées.

5 A cet effet on a inoculé des cultures de fibroblastes embryonnaires de souris transgéniques ou de souris non transgéniques par le virus HSV-1.

On a ensuite dénombré les plages de lyse provoquées par le virus dans la culture cellulaire 5 jours après l'inoculation, et constaté que  
10 le nombre de ces plages était nettement plus important dans le cas des fibroblastes de souris non transgéniques que dans le cas de fibroblastes de souris transgéniques.

On a parallèlement effectué un test similaire pour le virus PRV en inoculant des cultures de fibroblastes embryonnaires issus de  
15 souris transgéniques ou de souris non transgéniques par le virus PRV, sans constater de différences notables entre le nombre de plages de lyse observé chez les souris transgéniques et chez les souris non transgéniques.

Ces résultats sont de nature à prouver que la protéine chimérique HVEMlg exprimée par les fibroblastes des souris transgéniques  
20 intervient dans l'inhibition de l'adsorption du virus HSV-1 par ces fibroblastes embryonnaires.

Dans un test complémentaire dont les résultats sont illustrés sur le tableau 5 on a recherché si la protéine chimérique HVEMlg  
25 présente dans le sérum de souris transgéniques pouvait inhiber la contamination de cultures cellulaires par les virus HSV-1 ou PRV.

Dans ce but, on a recueilli du sérum de souris transgéniques de la lignée C et incubé avec un inoculat de ce sérum le virus HSV-1 ou le virus PRV avant de le mettre en contact avec des cultures de cellules  
30 Vero.

On a ainsi pu établir que le sérum de souris transgéniques de la lignée C peut protéger des cellules Vero d'une contamination par le virus HSV-1 mais pas d'une contamination par le virus PRV.

Un test de contrôle effectué avec du sérum de souris non  
35 transgéniques n'a au contraire pas permis de constater d'activité antivirale.

On a par ailleurs constaté que le sérum des souris transgéniques de la lignée C ne présente plus d'activité antivirale après qu'il ait

souris transgéniques de la lignée A et des souris non transgéniques de la même portée (tableau 2 et figure 5).

On a ainsi pu constater qu'à l'exception d'une souris transgénique qui a survécu pendant 10 jours toutes les souris sont décédées dans les cinq jours suivant l'inoculation par le virus PRV.

Par suite les souris transgéniques exprimant la protéine chimérique HVEMlg ne se sont pas révélées protégées contre le virus PRV.

Dans le cadre de cette étude, on a également cherché à déterminer si la résistance des souris transgéniques à l'inoculation par le virus HSV-1 ayant pu être constatée *in vivo* s'accompagnait en parallèle d'une résistance des cellules de ces souris une fois isolées.

A cet effet on a inoculé des cultures de fibroblastes embryonnaires de souris transgéniques ou de souris non transgéniques par le virus HSV-1.

On a ensuite dénombré les plages de lyse provoquées par le virus dans la culture cellulaire 5 jours après l'inoculation, et constaté que le nombre de ces plages était nettement plus important dans le cas des fibroblastes de souris non transgéniques que dans le cas de fibroblastes de souris transgéniques.

On a parallèlement effectué un test similaire pour le virus PRV en inoculant des cultures de fibroblastes embryonnaires issus de souris transgéniques ou de souris non transgéniques par le virus PRV, sans constater de différences notables entre le nombre de plages de lyse observé chez les souris transgéniques et chez les souris non transgéniques.

Ces résultats sont de nature à prouver que la protéine chimérique HVEMlg exprimée par les fibroblastes des souris transgéniques intervient dans l'inhibition de l'adsorption du virus HSV-1 par ces fibroblastes embryonnaires.

Dans un test complémentaire dont les résultats sont illustrés sur le tableau 5 on a recherché si la protéine chimérique HVEMlg présente dans le sérum de souris transgéniques pouvait inhiber la contamination de cultures cellulaires par les virus HSV-1 ou PRV.

Dans ce but, on a recueilli du sérum de souris transgéniques de la lignée C et incubé avec un inoculat de ce sérum le virus HSV-1 ou le virus PRV avant de le mettre en contact avec des cultures de cellules Vero.

été mis en contact avec un sérum polyclonal anti-HVEMIg produit par hyperimmunisation sur lapin pendant 30 minutes à température ambiante.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'activité antivirale constatée provient de la protéine chimérique HVEMIg présente dans le  
5 sérum des souris transgéniques, mais sont également sans doute associés à l'expression de cette protéine chimérique à la surface des cellules de l'hôte telles les fibroblastes embryonnaires évalués dans ces tests.

On a ainsi pu établir que le sérum de souris transgéniques de la lignée C peut protéger des cellules Vero d'une contamination par le virus HSV-1 mais pas d'une contamination par le virus PRV.

5 Un test de contrôle effectué avec du sérum de souris non transgéniques n'a au contraire pas permis de constater d'activité antivirale.

10 On a par ailleurs constaté que le sérum des souris transgéniques de la lignée C ne présente plus d'activité antivirale après qu'il ait été mis en contact avec un sérum polyclonal anti-HVEMIg produit par hyperimmunisation sur lapin pendant 30 minutes à température ambiante.

15 L'ensemble de ces résultats démontre que l'activité antivirale constatée provient de la protéine chimérique HVEMIg présente dans le sérum des souris transgéniques, mais sont également sans doute associés à l'expression de cette protéine chimérique à la surface des cellules de l'hôte telles les fibroblastes embryonnaires évalués dans ces tests.

TABLEAU 1  
Résistance des souris transgéniques de la lignée A  
à une inoculation par le virus HSV-1

Essai	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort
I	A1	M	14.8	-	
	A2	M	10.0	-	
	A3	M	11.6	-	
	A4	F	7.6	-	
	A5	F	8.3	-	
	A6	F	10.0	-	
	A7	F	24.6	-	
	A8	F	8.5	-	
	A9	F	7.9	-	
	A10	F	7.3	-	
	L1	M	1.5	-	
	L2	M	1.1	-	
	L3	M	1.6	+	4
	L4	M	0.8	+	14
	L5	M	1.6	+	
	L6	F	0.6	+	5
II	A11	M	10.1		
	A12	M	15.9		
	A13	M	10.5		
	A14	M	9.3		
	A15	F	7.3		
	A16	F	14.0		
	A17	F	15.4		
	A18	F	14.9		
	L7	M	0.4	+	4
	L8	M	0.5	+	
	L9	F	0.5	+	

TABLEAU 1  
Résistance des souris transgéniques de la lignée A  
à une inoculation par le virus HSV-1

Essai	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort
I	A1	M	14.8	-	
	A2	M	10.0	-	
	A3	M	11.6	-	
	A4	F	7.6	-	
	A5	F	8.3	-	
	A6	F	10.0	-	
	A7	F	24.6	-	
	A8	F	8.5	-	
	A9	F	7.9	-	
	A10	F	7.3	-	
	L1	M	1.5	-	
	L2	M	1.1	-	
	L3	M	1.6	+	4
	L4	M	0.8	+	14
	L5	M	1.6	+	
	L6	F	0.6	+	5
II	A11	M	10.1		
	A12	M	15.9		
	A13	M	10.5		
	A14	M	9.3		
	A15	F	7.3		
	A16	F	14.0		
	A17	F	15.4		
	A18	F	14.9		
	L7	M	0.4	+	4
	L8	M	0.5	+	
	L9	F	0.5	+	

TABLEAU 2  
Sensibilité des souris transgéniques de la lignée A  
à une inoculation par le virus PRV

	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort
	A19	M	41.2	+	4
	A20	F	19.4	+	10
	A21	F	29.6	+	5
	A22	F	24.2	+	5
	A23	F	20.2	+	5
	C57BL/6	M	NT	+	4
	C57BL/6	M	NT	+	4
	C57BL/6	M	NT	+	5
	C57BL/6	M	NT	+	5
	C57BL/6	M	NT	+	5

TABLEAU 2  
Sensibilité des souris transgéniques de la lignée A  
à une inoculation par le virus PRV

	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort
	A19	M	41.2	+	4
	A20	F	19.4	+	10
	A21	F	29.6	+	5
	A22	F	24.2	+	5
	A23	F	20.2	+	5
	C57BL/6	M	NT	+	4
	C57BL/6	M	NT	+	4
	C57BL/6	M	NT	+	5
	C57BL/6	M	NT	+	5
	C57BL/6	M	NT	+	5



TABLEAU 3  
Résistance des souris transgéniques de la lignée B  
à une inoculation par le virus HSV-1

Essai	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort	RT-PCR
I	B1	M	8.5	-		-
	B2	M	7.8	-		-
	B3	M	7.7	-		-
	B4	F	8.1	+	11	
	L1	M	0.4	+	6	
	L2	M	0.7	+	6	
	L3	M	0.5	+	5	
	L4	M	0.7	+	7	
	L5	F	0.3	+	5	
	B5	M	5.0	-		+
	B6	M	6.2	-		-
	B7	F	4.4	-		-
II	L6	M	0.6	-		
	L7	M	0.6	+	10	
	L8	M	0.5	+	7	
	L9	M	0.6	+		+
	L10	F	0.4	+	7	
	L11	F	0.5	+	5	
	L12	F	0.5	+	5	
	L13	F	0.5	+	5	
	L14	F	0.4	+	6	

**TABLEAU 3**  
**Résistance des souris transgéniques de la lignée B**  
**à une inoculation par le virus HSV-1**

Essai	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort	RT-PCR
I	B1	M	8.5	-		-
	B2	M	7.8	-		-
	B3	M	7.7	-		-
	B4	F	8.1	+	11	
	L1	M	0.4	+	6	
	L2	M	0.7	+	6	
	L3	M	0.5	+	5	
	L4	M	0.7	+	7	
	L5	F	0.3	+	5	
	B5	M	5.0	-		+
	B6	M	6.2	-		-
	B7	F	4.4	-		-
II						
	L6	M	0.6	-		
	L7	M	0.6	+	10	
	L8	M	0.5	+	7	
	L9	M	0.6	+		+
	L10	F	0.4	+	7	
	L11	F	0.5	+	5	
	L12	F	0.5	+	5	
	L13	F	0.5	+	5	
	L14	F	0.4	+	6	

TABLEAU 4  
Résistance des souris transgéniques de la lignée C  
à une inoculation par le virus HSV-1

Essai	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort	RT-PCR
	C1	M	20.4	-		-
	C2	M	14.2	-		-
	C3	F	19.3	-		-
	C4	F	18.5	-		-
	C5	F	24.3	-		-
	C6	F	21.8	-		-
	C7	F	24.0	-		-
	C8	F	20.6	-		-
	L1	M	1.3	-		-
	L2	M	0.9	+		+
	L3	M	1.6	+	6	
	L4	F	1.3	+	5	
	L5	F	1.4	+	5	
	L6	F	1.5	+	6	
	L7	F	1.6	+	5	

TABLEAU 4  
Résistance des souris transgéniques de la lignée C  
à une inoculation par le virus HSV-1

Essai	Numéro de l'animal	Sexe	HVEMlg (ug/ml)	Symptômes	Jour de la mort	RT-PCR
	C1	M	20.4	-		-
	C2	M	14.2	-		-
	C3	F	19.3	-		-
	C4	F	18.5	-		-
	C5	F	24.3	-		-
	C6	F	21.8	-		-
	C7	F	24.0	-		-
	C8	F	20.6	-		-
	L1	M	1.3	-		-
	L2	M	0.9	+		+
	L3	M	1.6	+	6	
	L4	F	1.3	+	5	
	L5	F	1.4	+	5	
	L6	F	1.5	+	6	
	L7	F	1.6	+	5	

TABLEAU 5

Neutralisation du virus HVS-1 par la protéine chimérique HVEMlg  
dans le sérum de souris transgéniques de la lignée C.

Inoculation de virus HSV1 sur cellules VERO, après incubation avec des  
concentrations variables de ce sérum

Serum (HVEMlg ug/ml)	Nombre de plages de lyse observées	
	HSV-1	PRV
(20.4)	0	108.0 ± 8.8
(2.04)	0	-
(0.20)	1.7 ± 1.6	-
(0.02)	34.7 ± 16.2	-
(0.20) + anti HVEMlg	30.3 ± 6.9	-
Contrôle	44.0 ± 0	107.3 ± 2.9

TABLEAU 5

Neutralisation du virus HVS-1 par la protéine chimérique HVEMlg  
dans le sérum de souris transgéniques de la lignée C.

Inoculation de virus HSV1 sur cellules VERO, après incubation avec des \_\_\_\_\_  
concentrations variables de ce sérum

5

Serum (HVEMlg ug/ml)	Nombre de plages de lyse observées	
	HSV-1	PRV
(20.4)	0	108.0 $\pm$ 8.8
(2.04)	0	-
(0.20)	1.7 $\pm$ 1.6	-
(0.02)	34.7 $\pm$ 16.2	-
(0.20) + anti HVEMlg	30.3 $\pm$ 6.9	-
Contrôle	44.0 $\pm$ 0	107.3 $\pm$ 2.9

# REVEN DICATIONS

1°) Procédé pour produire un mammifère appartenant à une espèce non humaine rendu résistant à une infection par un alpha herpès virus par transgénèse germinale,

5 caractérisé en ce que

l'on introduit par insertion ou recombinaison homologue dans le génome des cellules constituant la lignée germinale du mammifère, un transgène codant pour une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire d'un récepteur cellulaire de l'alpha herpès virus visé ou de l'une de ses parties et d'autre part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline, dans un système d'expression approprié.

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que

15 l'immunoglobuline est une immunoglobuline de type gamma.

3°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que

le récepteur de l'alpha herpès virus visé et/ou l'immunoglobuline appartiennent à l'espèce homologue.

4°) Mammifère appartenant à une espèce non humaine, caractérisé en ce qu'

il a été rendu résistant par transgénèse germinale à une infection par un alpha herpès virus par l'effet de l'expression d'une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire d'un récepteur de l'alpha herpès virus visé ou de l'une de ses parties, de préférence de l'espèce homologue, et d'autre part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline, notamment d'une immunoglobuline de type gamma, de préférence de l'espèce homologue.

5°) Mammifère selon la revendication 4, caractérisé en ce que

le récepteur spécifique de l'alpha herpès virus est la nectin-1 ou HveC.

6°) Mammifère selon la revendication 5, caractérisé en ce que

### REVENDEICATIONS

1°) Procédé pour produire un mammifère appartenant à une espèce non humaine rendu résistant à une infection par un alpha herpès virus par transgénèse germinale, \_\_\_\_\_

5 caractérisé en ce que

l'on introduit par insertion ou recombinaison homologue dans le génome des cellules constituant la lignée germinale du mammifère ou de l'un de ses ancêtres, un transgène codant pour une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire d'un récepteur cellulaire de l'alpha herpès virus visé ou de l'une de ses parties et d'autre part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline, dans un système d'expression approprié.

2°) Procédé selon la revendication 1,

15 caractérisé en ce que

l'immunoglobuline est une immunoglobuline de type gamma.

3°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que

20 le récepteur de l'alpha herpès virus visé et/ou l'immunoglobuline appartiennent à l'espèce homologue.

4°) Mammifère appartenant à une espèce non humaine, caractérisé en ce qu'

25 il a été rendu résistant par transgénèse germinale à une infection par un alpha herpès virus par l'effet de l'expression d'une protéine chimérique constituée d'une part du domaine extracellulaire d'un récepteur de l'alpha herpès virus visé ou de l'une de ses parties, de préférence de l'espèce homologue, et d'autre part du fragment cristallisable d'une immunoglobuline, notamment d'une immunoglobuline de type gamma, de préférence de l'espèce homologue.

5°) Mammifère selon la revendication 4, caractérisé en ce que

35 le récepteur spécifique de l'alpha herpès virus est la nectin-1 ou HveC.

6°) Mammifère selon la revendication 5, caractérisé en ce que



le récepteur spécifique de l'alpha herpès virus est le domaine V de la nectin-1 ou HveC.

7°) Mammifère selon l'une quelconque des revendications 4 à 6,  
5 caractérisé en ce qu'  
il appartient à l'espèce porcine et que l'alpha herpès virus est le virus PRV.

8°) Mammifère selon l'une quelconque des revendications 4 à 7,  
caractérisé en ce qu'  
10 il renferme dans le génome de ses cellules, un transgène codant pour une  
protéine chimérique constituée d'une part du domaine extra cellulaire  
d'un récepteur cellulaire de l' $\alpha$ -herpès virus visé ou de l'une de ses parties,  
et d'autre part du fragment cristallisable d'une immuno globuline, dans  
un système d'expression approprié, ce transgène ayant été inséré dans le  
15 génome de la lignée germinale de l'un de ses parents.

le récepteur spécifique de l'alpha herpès virus est le domaine V de la nectin-1 ou HveC.

- 7°) Mammifère selon l'une quelconque des revendications 4 à 6,  
5 caractérisé en ce qu'  
il appartient à l'espèce porcine et que l'alpha herpès virus est le virus PRV.
- 8°) Descendant d'un mammifère selon l'une quelconque des revendications 4 à 7,  
10 caractérisé en ce qu'  
il a hérité par descendance du transgène inséré dans le génome de la lignée germinale de l'un de ses parents.

1/2

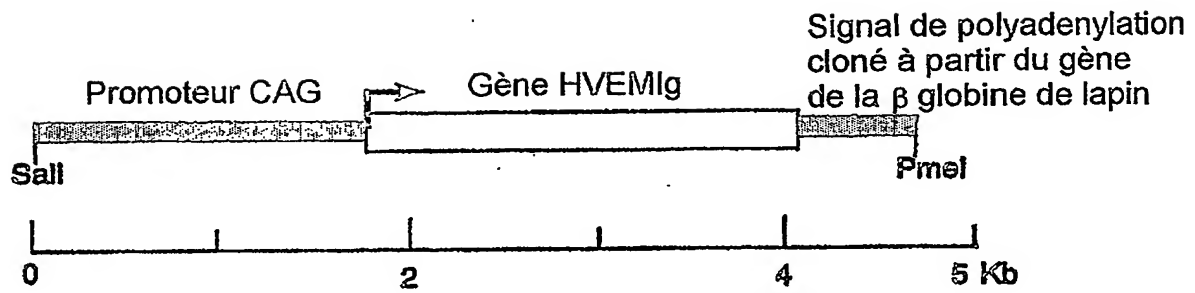


FIGURE 1

FIGURE 2

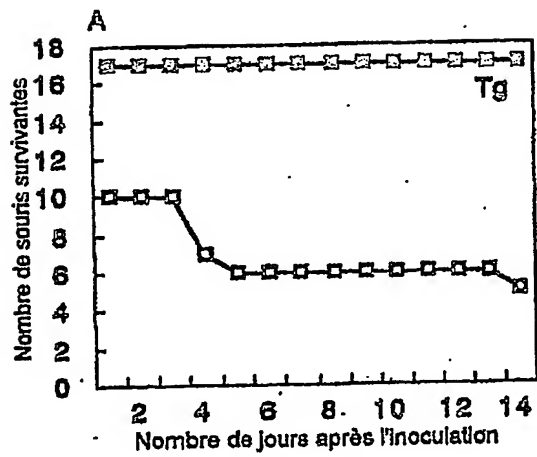


FIGURE 3

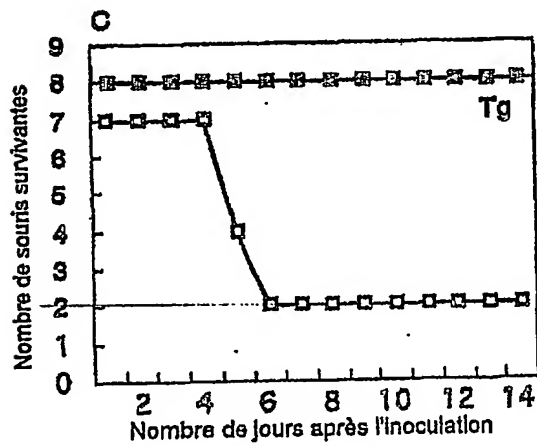
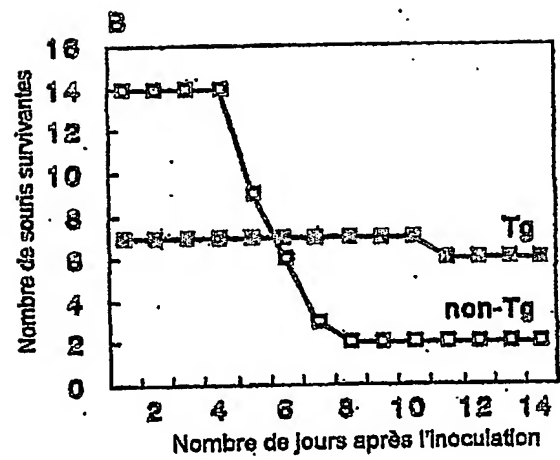


FIGURE 4

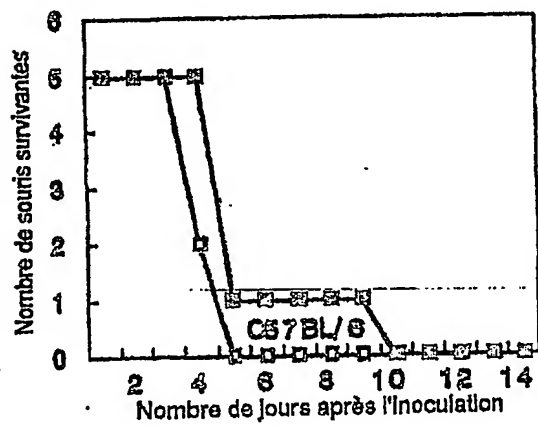


FIGURE 5

# LISTE DE SEQUENCES

<110> FRANCE HYBRIDES

<120> Procédé pour produire un mammifère rendu résistant à une infection par un alpha herpès virus par transgénèse germinale ainsi que mammifère obtenu par la mise en oeuvre de ce procédé

<130> HVEMIg

<140> Fr02 12775

<141> 2002-10-15

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 439

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: récepteur HVEM cloné chez la souris et fraction IgG1 humaine

<400> 1

Met Glu Pro Leu Pro Gly Trp Gly Ser Ala Pro Trp Ser Gln Ala Pro  
1 5 10 15

Thr Asp Asn Thr Phe Arg Leu Val Pro Cys Val Phe Leu Leu Asn Leu  
20 25 30

Leu Gln Arg Ile Ser Ala Gln Pro Ser Cys Arg Gln Glu Glu Phe Leu  
35 40 45

Val Gly Asp Glu Cys Cys Pro Met Cys Asn Pro Gly Tyr His Val Lys  
50 55 60

Gln Val Cys Ser Glu His Thr Gly Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Pro  
65 70 75 80

Gln Thr Tyr Thr Ala His Ala Asn Gly Leu Ser Lys Cys Leu Pro Cys  
85 90 95

Gly Val Cys Asp Pro Asp Met Gly Leu Leu Thr Trp Gln Glu Cys Ser  
100 105 110

Ser Trp Lys Asp Thr Val Cys Arg Cys Ile Pro Gly Tyr Phe Cys Glu  
115 120 125

Asn Gln Asp Gly Ser His Cys Ser Thr Cys Leu Gln His Thr Thr Cys  
130 135 140

Pro Pro Gly Gln Arg Val Lys Arg Gly Thr His Asp Gln Asp Thr Val

145				150				155				160			
Cys	Ala	Asp	Cys	Leu	Thr	Gly	Thr	Phe	Ser	Leu	Gly	Gly	Thr	Gln	Glu
				165					170					175	
Glu	Cys	Leu	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	Ser	Ala	Phe	Gln	Gln	Glu	Val	Arg
			180					185					190		
Arg	Gly	Thr	Asn	Ser	Thr	Asp	Thr	Thr	Cys	Ser	Ser	Asp	Pro	Glu	Glu
			195				200					205			
Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
			210			215					220				
Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
					230					235					240
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
				245					250				255		
Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
			260					265				270			
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
			275				280					285			
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
			290			295					300				
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
					310					315					320
Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
				325					330				335		
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
			340					345				350			
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
			355				360					365			
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
						375					380				
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
					390					395					400
Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
				405					410				415		
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
			420					425					430		
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
				435											

<210> 2  
 <211> 580  
 <212> PRT  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle: récepteur  
 HveC cloné chez le porc et fraction IgG1 humaine

<400> 2  
 Met Ala Arg Met Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Arg Trp Trp Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Gly Leu Thr Ala Phe Phe Leu Pro Gly Ala His Thr Gln Val  
 20 25 30  
 Val Gln Val Asn Asp Ser Met Tyr Gly Phe Ile Gly Thr Asp Val Val  
 35 40 45  
 Leu His Cys Ser Phe Ala Asn Pro Leu Pro Gly Val Lys Ile Thr Gln  
 50 55 60  
 Val Thr Trp Gln Lys Ala Thr Asn Gly Ser Lys Gln Asn Val Ala Ile  
 65 70 75 80  
 Tyr Asn Pro Ala Met Gly Val Ser Val Leu Ala Pro Tyr Arg Glu Arg  
 85 90 95  
 Val Glu Phe Leu Arg Pro Ser Phe Thr Asp Gly Thr Ile Arg Leu Ser  
 100 105 110  
 Arg Leu Glu Leu Glu Asp Glu Gly Val Tyr Ile Cys Glu Phe Ala Thr  
 115 120 125  
 Phe Pro Ala Gly Asn Arg Glu Ser Gln Leu Asn Leu Thr Val Met Ala  
 130 135 140  
 Lys Pro Thr Asn Trp Ile Glu Gly Thr Gln Ala Val Leu Arg Ala Lys  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Lys Asp Asp Lys Val Leu Val Ala Thr Cys Thr Ser Ala Asn  
 165 170 175  
 Gly Lys Pro Pro Ser Val Val Ser Trp Glu Thr His Leu Lys Gly Glu  
 180 185 190  
 Ala Glu Tyr Gln Glu Ile Arg Asn Pro Asn Gly Thr Val Thr Val Ile  
 195 200 205  
 Ser Arg Tyr Arg Leu Val Pro Ser Arg Glu Asp His Arg Gln Ser Leu  
 210 215 220  
 His Cys Ile Val Asn Tyr His Met Asp Arg Phe Arg Glu Ser Leu Thr  
 225 230 235 240

Leu Asn Val Gln Tyr Glu Pro Glu Val Thr Ile Glu Gly Phe Asp Gly  
245 250 255

Asn Trp Tyr Leu Gln Arg Met Asp Val Lys Leu Thr Cys Lys Ala Asp  
260 265 270

Ala Asn Pro Pro Ala Thr Glu Tyr His Trp Thr Thr Leu Asn Gly Ser  
275 280 285

Leu Pro Lys Gly Val Glu Ala Gln Asn Arg Thr Leu Phe Phe Arg Gly  
290 295 300

Pro Ile Asn Tyr Ser Met Ala Gly Thr Tyr Ile Cys Glu Ala Thr Asn  
305 310 315 320

Pro Ile Gly Thr Arg Ser Gly Gln Val Glu Val Asn Ile Thr Glu Phe  
325 330 335

Pro Tyr Thr Pro Ser Pro Pro Glu His Ala Asp Pro Glu Glu Pro Lys  
340 345 350

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
355 360 365

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
370 375 380

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Val Val Val Asp Val Ser  
385 390 395 400

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
405 410 415

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
420 425 430

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
435 440 445

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
450 455 460

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
465 470 475 480

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
485 490 495

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
500 505 510

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
515 520 525

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
530 535 540



Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val
545					550					555					560

Met His Glu Ala Leu His Asn His ~~Tyr~~ Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
565 570 575

Ser Pro Gly Lys  
580

<210> 3

<211> 376

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: domaine V  
seul du recepteur Hvec cloné chez le porc et  
fraction IgG1 porcine

<400> 3

Met Ala Arg Met Gly Leu Ala Gly Ala Ala Gly Arg Trp Trp Gly Leu  
1 5 10 15

Ala Leu Gly Leu Thr Ala Phe Phe Leu Pro Gly Ala His Thr Gln Val  
20 25 30

Val Gln Val Asn Asp Ser Met Tyr Gly Phe Ile Gly Thr Asp Val Val  
35 40 45

Leu His Cys Ser Phe Ala Asn Pro Leu Pro Gly Val Lys Ile Thr Gln  
50 55 60

Val	Thr	Trp	Gln	Lys	Ala	Thr	Asn	Gly	Ser	Lys	Gln	Asn	Val	Ala	Ile
65					70					75					80

Tyr Asn Pro Ala Met Gly Val Ser Val Leu Ala Pro Tyr Arg Glu Arg  
85 90 95

Val Glu Phe Leu Arg Pro Ser Phe Thr Asp Gly Thr Ile Arg Leu Ser  
100 105 110

Arg Leu Glu Leu Glu Asp Glu Gly Val Tyr Ile Cys Glu Phe Ala Thr  
110 120 125

Phe Pro Ala Gly Asn Arg Glu Ser Gln Leu Asn Leu Thr Val Met Gly  
130 135 140

Ser Val Gly Ile His Gln Pro Gln Thr Cys Pro Ile Cys Pro Gly Cys  
 145 150 155 160

Glu Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
105 170 175

Thr Leu Met Ile Ser Gln Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

	180						185						190					
Val Ser	Lys 195	Glu	His	Ala	Glu	Val 200	Gln	Phe	Ser	Trp	Tyr 205	Val	Asp	Gly				
Val 210	Glu	Val	His	Thr	Ala	Glu 215	Thr	Arg	Pro	Lys	Glu 220	Glu	Gln	Phe	Asn			
Ser 225	Thr	Tyr	Arg	Val	Val 230	Ser	Val	Leu	Pro	Ile 235	Gln	His	Gln	Asp	Trp 240			
Leu	Lys	Gly	Lys	Glu 245	Phe	Lys	Cys	Lys	Val 250	Asn	Asn	Val	Asp	Leu 255	Pro			
Ala	Pro	Ile	Thr 260	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys 265	Ala	Ile	Gly	Gln	Ser 270	Arg	Glu			
Pro	Gln	Val 275	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro 280	Pro	Ala	Glu	Glu	Leu 285	Ser	Arg	Ser			
Lys 290	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Leu 295	Val	Ile	Gly	Phe	Tyr 300	Pro	Pro	Asp	Ile			
His 305	Val	Glu	Trp	Lys	Ser 310	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu 315	Pro	Glu	Asn	Thr	Tyr 320			
Arg	Thr	Thr	Pro	Pro 325	Gln	Gln	Asp	Val	Asp 330	Gly	Thr	Phe	Phe	Leu 335	Tyr			
Ser	Lys	Leu	Ala 340	Val	Asp	Lys	Ala	Arg 345	Trp	Asp	His	Gly	Asp 350	Lys	Phe			
Glu	Cys	Ala 355	Val	Met	His	Glu	Ala 360	Leu	His	Asn	His	Tyr 365	Thr	Gln	Lys			
Ser 370	Ile	Ser	Lys	Thr	Gln	Gly 375	Lys											



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**  
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

  
N° 11235\*03

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1.. / 1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et  
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 6 V / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		02 12 775
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
Procédé pour produire un mammifère rendu résistant à une infection par un alpha herpès virus par transgénèse germinale ainsi que mammifère obtenu par la mise en oeuvre de ce procédé		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
FRANCE HYBRIDES		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	<b>Nom</b>	Etsuro ONO, DVM, Ph.D.,
	<b>Prénoms</b>	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	Fukui 4-15-7 Nishi-ku
	<b>Code postal et ville</b>	11111 Sapporo 063-0012 (JAPON)
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>		
<b>2</b>	<b>Nom</b>	Toshimitsu Uede, MD, Ph.D.,
	<b>Prénoms</b>	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	Shin-ei 5-3-8-2 Kiyota-ku
	<b>Code postal et ville</b>	11111 Sapporo 004-0835 (JAPON)
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>		
<b>3</b>	<b>Nom</b>	
	<b>Prénoms</b>	
<b>Adresse</b>	<b>Rue</b>	
	<b>Code postal et ville</b>	11111
<b>Société d'appartenance (facultatif)</b>		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		
23 Octobre 2002 CABINET HERRBURGER Pierre HERRBURGER CPI.92-1114		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.